

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-047001

(43)Date of publication of application : 18.03.1983

(51)Int.Cl.

C08B 37/00

B01J 20/24

C07G 17/00

(21)Application number : 56-147232

(71)Applicant : SUMITOMO CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 17.09.1981

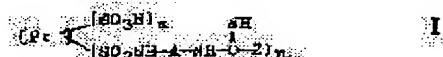
(72)Inventor : HAYATSU HIKOYA  
TEZUKA YASUO

## (54) PHTHALOCYANINE/SUGAR CONJUGATE, ITS PRODUCTION AND TREATMENT OF MUTAGENIC SUBSTANCE WITH THE SAME

## (57)Abstract:

PURPOSE: A phthalocyanine/sugar conjugate useful in removing by adsorption, a mutagenic substance present in a solution in a trivial amount, prepared by coupling an activated polysaccharide with a ligand which is a water-soluble compound having a phthalocyanine nucleus.

CONSTITUTION: A phthalocyanine/sugar conjugate represented, in its free acid form, by formula I, wherein Pc is a metallized or nonmetallized phthalocyanine residue, A is a 2W6C alkylene, a monocyclic W tricyclic arylene,  $2 < m+n \leq 4$ ,  $1 \leq n \leq 2$  and Z is a residue of an activated polysaccharide, or by formula II, wherein CuPo is a copper phthalocyanine residue. The conjugate is prepared by coupling a ligand which is a water-soluble compound of formula III with an activated polysaccharide. A mutagenic substance can be treated by effecting adsorption of the mutagenic substance in solution by the phthalocyanine/sugar conjugate and, if necessary, effecting its desorption.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

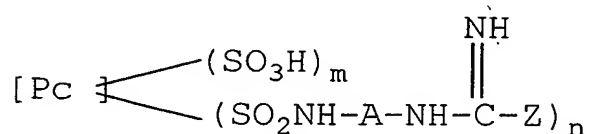
[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## Claims

1. A phthalocyanine-saccharide conjugate, which in the form of free acid has the following formula:



5 wherein Pc is a metal-containing or metal-free phthalocyanine residue, A is an alkylene group of 2 to 6 carbon atoms, m and n satisfy  $2 < m+n \leq 4$  and  $1 \leq n \leq 2$ , and Z is an activated agarose residue.

## ⑫ 特 許 公 報 (B-2)

昭61-13481

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 昭和61年(1986)4月14日

C 08 B 37/12  
B 01 J 20/247133-4C  
7106-4G

発明の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 フタロシアニン糖結合体、その製法およびそれを用いる変異原性物質の処理法

前置審査に係属中

⑯ 特 願 昭56-147232

⑰ 公 開 昭58-47001

Date of filing ← ⑱ 出 願 昭56(1981)9月17日

⑲ 昭58(1983)3月18日

特許法第30条第1項適用 昭和56年7月18日 日本薬学会中国支部 第61回例会講演要旨集に発表

⑳ 発 明 者 早 津 彦 哉 岡山市津島中一丁目4番 1-201号

㉑ 発 明 者 手 塚 康 男 茨木市舟木町7番3号

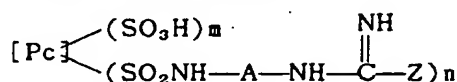
㉒ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪市東区北浜5丁目15番地

㉓ 代 理 人 弁理士 木村 勝哉

審 査 官 今 井 勲

## ㉔ 特許請求の範囲

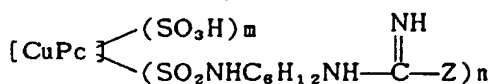
## 1. 遊離酸の形で一般式



(式中Pcは、金属含有又は金属を含まないフタロシアニン残基を表わし、Aは炭素2～6個のアルキレン基を表わし、m及びnは $2 < m+n \leq 4$ で且つ $1 \leq n \leq 2$ を満たす。Zは活性化されたアガロースの残基を表わす。)

で表わされるフタロシアニン糖結合体。

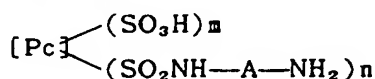
## 2. 遊離酸の形で下記式



(式中CuPcは銅フタロシアニン残基を表わし、Zは前述の意味を表わす。)

で表わされる特許請求の範囲第1項のフタロシアニン糖結合体。

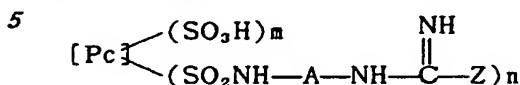
## 3. 遊離酸の形で一般式



(式中Pcは、金属含有又は金属を含まないフタロシアニン残基を表わし、Aは炭素2～6個のアルキレン基を表わし、m及びnは $2 < m+n \leq$

4で且つ $1 \leq n \leq 2$ を満たす。)

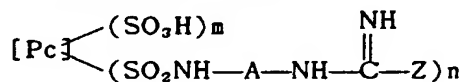
で示される水溶性化合物をリガンドとし、活性化されたアガロースとカップリングさせることを特徴とする一般式



(式中Pc, A, m, nは前記の意味を有し、Zは活性化されたアガロースの残基を表わす。)

10 で示されるフタロシアニン糖結合体の製法。

## 4. 遊離酸の形で一般式



15 (式中Pcは、金属含有又は金属を含まないフタロシアニン残基を表わし、Aは炭素2～6個のアルキレン基を表わし、m及びnは $2 < m+n \leq 4$ で且つ $1 \leq n \leq 2$ を満たす。Zは活性化されたアガロースの残基を表わす。)

20 で示されるフタロシアニン糖結合体を用いて溶液中の変異原性物質を吸着させ、ついで必要により脱着させることを特徴とする変異原性物質の処理法。

## 発明の詳細な説明

本発明は溶液、特に水溶液中に微量に混在する変異原性物質の選択的な吸着除去に有用な金属含

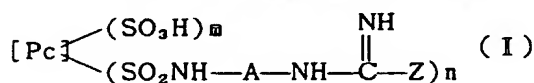
有又は不含有フタロシアニン-糖結合体に関するものである。

近年、環境、食品等に微量に混在する有害物質、特に環境変異原等の変異原物質のヒトに及ぼす影響が注目されるに至っている。このため、これらの物質のヒトに与える影響の研究とともに、その除去技術の開発は重要な課題であつた。

本発明はかかる見地から溶液、特に水溶液中に微量に混在する変異原性物質の選択的な吸着除去に有用な、新規な処理剤を提供することを目的として形成されたものである。

一般に、ゲル形成能多糖類を、例えばシアノゲンブロミドのような活性化剤を用いて活性化して得られた活性化多糖類と、タンパク質や核酸のようなリガンドをカップリングさせ、生成するリガンド-多糖類結合体が、特異的抗体の分画、精製やDNAに結合する酵素の精製等に利用されていた。本発明者らはこの性質を利用して有害物質を選択的に除去すべく種々のリガンドについて追求した結果、遂に本発明に到達した。

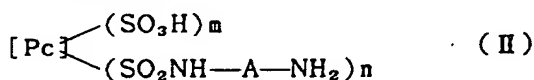
すなわち本発明は、遊離酸の形で一般式 (I)



(式中Pcは、金属含有又は金属を含まないフタロシアニン残基を表わし、Aは炭素2～6個のアルキレン基を表わし、m及びnは $2 < m+n \leq 4$ で且つ $1 \leq n \leq 2$ を満す。Zは活性化されたアガロースの残基を表わす。)

で表わされるフタロシアニン糖結合体、及びその製法、及びそれを用いる変異原性物質の処理法である。

本発明のフタロシアニン糖結合体は、遊離酸の形で一般式 (II)



(式中Pcは、金属含有又は金属を含まないフタロシアニン残基を表わし、Aは炭素数2～6個のアルキレン基を表わし、m及びnは $2 < m+n \leq 4$ 、 $1 \leq n \leq 2$ を同時に満す。)

で示される水溶性化合物をリガンドとし、活性化されたアガロースとカップリングさせて得られる。

本発明の一般式 (I) で示される水溶性化合物のフタロシアニン核に含まれる金属の種類としては、例えば銅、鉄、ニッケル、コバルト、アルミニウム等を挙げることができる。又アルキレン基としては、直鎖状又は分枝状のアルキレン基があげられる。

次に本発明のフタロシアニン糖結合体の製法を詳しく述べる。例えばフタロシアニン化合物とクロロスルホン酸とを $130 \sim 135^\circ C$ にて反応させ、氷水に排出して得られる結晶を濾過し、氷水で洗浄してクロロスルホン-スルホ銅フタロシアニン化合物のウェットケーキを得る。このウェットケーキを $0 \sim 5^\circ C$ の冷水中に加え、アルカリにてpH 5まで中和した後、 $15^\circ C$ まで昇温する。一般式  $H_2N-A-NH_2$  (式中Aは、前記の意味を表わす。) で示されるジアミン (フタロシアニンに対して1～1.5モル倍量) を一挙に加えた後 $20 \sim 25^\circ C$ に保温し、この間アルカリにてpH 9～11に保持する。かくして一般式 (II) で示される化合物のリガント溶液を得る。

別に糖誘導体をリン酸カリウムバッファ-液 (pH11.9) 中シアノゲンブロミドと反応させてシアノゲンブロミド活性化糖を調製しておき、前記リガント溶液と混合し、室温にて一夜振とうしカップリングさせる。カップリング終了後、低分子第1級アミンにて余剰の活性基をブロックさせて得られたフタロシアニン-糖結合体を酢酸バッファ-液及び重曹バッファ-液にて十分洗浄する。

本発明のフタロシアニン-糖結合体は、溶液特に水溶液中に、希薄な状態で存在する変異原性物質とりわけ含窒素変異原性物質に対して選択的吸着除去効果を示す。また、本発明においては一定量吸着後、脱着させることにより変異原性物質の濃縮を行うこともできる。

以下、本発明を実施例にてさらに詳しく説明する。例中部は重量部を意味する。

#### 実施例

##### 1 (N-(6-アミノヘキシル) スルファモイル)-ポリスルホフタロシアニナト銅の合成

クロロスルホン酸184部の中に、 $20 \sim 25^\circ C$ で攪拌しながらフタロシアニナト銅23.7部を加える。その後1時間で $130^\circ C$ まで昇温し次いで $130 \sim 135^\circ C$ にて10時間保温攪拌する。反応終了後

5

50°Cまで冷却し、水170部に氷770部及び塩化ナトリウム43部を加えた氷水中に約30分間かけてゆつくりと排出する。排出終了後、吸引ろ過し、水200部を氷にて5°Cに冷却した後冷水を用い、3回に分けて洗浄する。得られたウェットケーキ全量を、水200部と氷100部の冷水中に懸濁させ、15%ソーダ灰水溶液にてpH5まで中和する。pH4~5に保持しつつ徐々に15°Cまで昇温し、15%ソーダ灰水液にてpH8に調整し、この液の中に10%ヘキサメチレンジアミン水溶液60部を一挙に加え、20°Cに昇温し、20~25°C、pH10~10.5に保持しながら6時間攪拌する。この反応液をこのまま80°Cにて40時間乾燥する。

〔N-(6-アミノヘキシル)スルファモイル〕-ポリスルホフタロシアニナト銅を主成分とする青色色素48部を得る。この色素は液体クロマトグラフィーによつてフタロシアニン核1個当り〔N-(6-アミノヘキシルスルファモイル)基の個数は0.54であつた。この色素は主成分のほかには不純色素としてポリスルホフタロシアニナト銅、N、N'-ヘキサメチレンビス(スルファモイル-ポリスルホフタロシアニナト銅)も含まれているが、これらは次の項で説明するカップリング後の洗浄により除去される。

## 2 シアノゲンブロミド活性化アガロースゲルの調製

セファロース4B(ファルシア社製)60部を水洗した後、0.5Mリン酸カリウム緩衝液(pH11.9)200部で洗浄する。別に0.5Mリン酸カリウム緩衝液120部中シアノゲンブロミド4.2部を0~5°Cで溶解させ、この溶解液を上記洗浄済セファロース4Bの中に徐々に加える。5°Cで約8分間振とうして反応を完結させ、まず水で十分に洗浄した後、塩化ナトリウムを0.5M濃度相当量を含む0.1Mの炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.3)(以下カップリング緩衝液という)で素早く洗浄する。

## 3 リガンド溶液の調製

1)で得られた〔N-(6-アミノヘキシル)スルファモイル〕-ポリスルホフタロシアニナト銅色素3部を、カップリング緩衝液120部の中に溶解し、不溶成分をろ過して除去

6

する。

## 4 フタロシアニン-糖結合体の調整

2)で得られたシアノゲンブロミド活性化アガロースゲル液の中に、3)で得られたリガンド液を加え、室温にて15時間振とうする。カップリング緩衝液で未反応のリガンドを洗い流した後、1Mモノエタノールアミン水溶液120部と混合し、4時間室温で振とうする。得られた液をカラムに移し、先ず8Mの尿素水溶液1000部で洗浄し、次いで3.8M塩化カリウム水溶液1000部で洗浄する。さらに水で十分に洗浄する。〔N-(6-アミノヘキシル)スルファモイル〕-ポリスルホフタロシアニナト銅-アガロース結合体のゲル溶液が得られる。

## 5 フタロシアニン-糖結合体中のフタロシアニンの定量

フタロシアニンには銅原子が1個結合していることを利用して銅原子を原子吸光法により定量した。

フタロシアニン-糖結合体10mlを乾燥させ秤量する(255mg)。5つのルツボにそれぞれ20mgを秤とり、500°C、10時間灰化操作を行う。これを6N塩酸5mlに溶かし、水で25mlにメスアップとしてサンプル溶液とする。

このサンプル溶液を原子吸光法により銅原子の濃度を測定した。これを硫酸銅溶液から求めた検量線により計算するとフタロシアニン-糖結合体1mlあたり296n moleの銅原子、すなわちフタロシアニンが結合していることがわかつた。

なお、市販されているセファロース4Bについても同様の操作を行つたが銅原子は含まれていなかった。

## 6 アフィニティークロマトグラフィーによる変異原の分離

4)で得た〔N-(6-アミノヘキシル)スルファモイル〕-ポリスルホフタロシアニナト銅-アガロース結合体のゲル溶液をカラムに詰める。(0.7×5.5cm、2.1ml)これを50mM Tris-HClバッファーpH9で平衡化した後、クロマトグラフィーを行う。

(i) Trp-P-1(トリプトファンを加熱分解して得られる変異原性物質の1種)300n mole(12.60 D A264)を1mlの50mM

7

8

Tris-HCl pH 9 に溶かし、カラムにかける。

同じバッファー、水、50%メタノールで順次溶出させ、Trp-P-1 の量を 264nm の吸光度によって定量した。このパターンを第 1 図に示した。

50mM Tris-HCl pH 9 バッファーを流しても Trp-P-1 は溶出しないが水、ついで 50%メタノールを加えると Trp-P-1 の溶出がみられた。回収率は 98% であった。

また、Trp-P-2 (トリプトファンを加熱分解して得られる変異原性物質の 1 種) 280nm mode (140D A264) についても同様の実験を行い、Trp-P-2 の量を 264nm の吸光度によって定量した。このパターンを第 2 図に示した。

Trp-P-1 と同様、水、50%メタノールを流すことによって Trp-P-2 の溶出がみとめられた。回収率は 97% であった。

(iii) 次に実際にトリプトファンを加熱分解して生じたタール及び残渣についてクロマトグラフィーを行う。トリプトファン 500mg を直火

で 4 分間加熱し、そのタールと残渣から塩基性画分(1)をとった。

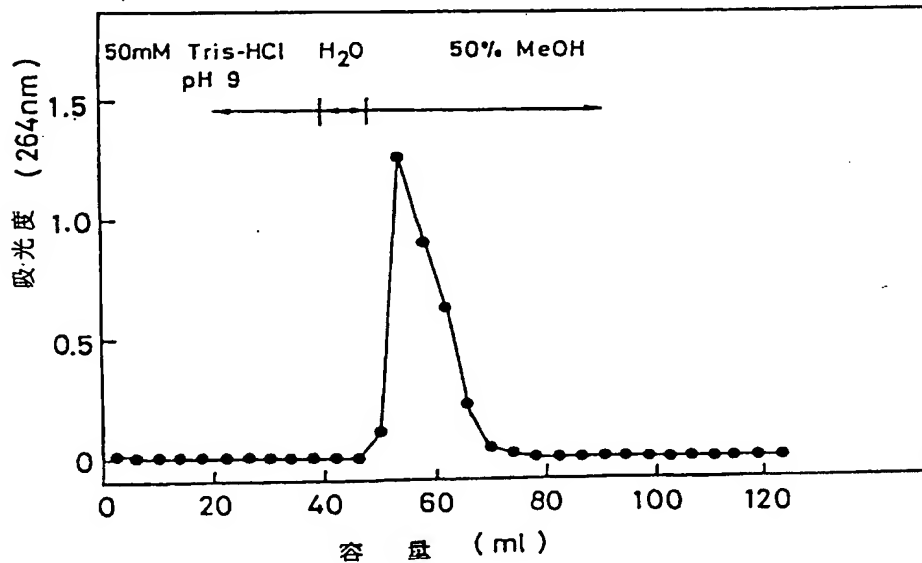
このうち、50mM Tris-HCl pH 9 に可溶なものをカラムによって分離した。トリプトファン 250mg 等量をカラムにかけ、4 ml ずつ分取した。溶出した各フラクションにつき 260nm の吸光量を測定した。また各フラクションにつき 260nm の吸光度を測定した。また各フラクションのうち、1/2 量について、TA98 (菌種)、+ S-9 (10 $\mu$ l) の条件で Ames テストを行った、このパターンを第 3 図に示した。

第 3 図から、80~100ml 付近で 50mM Tris-HCl pH 9 により溶出するものは殆んどなくなり、ついで、水、50%メタノールにより吸着した変異原物質が分離したことがわかる。

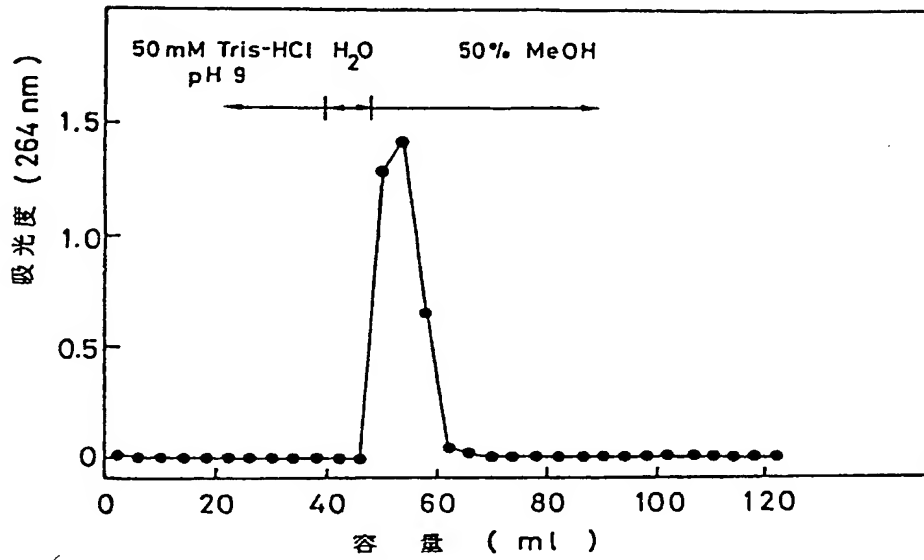
図面の簡単な説明

第 1 図は Trp-P-1 の吸着溶出パターン、第 2 図は Trp-P-2 の吸着溶出パターン、そして第 3 図はトリプトファンの加熱により生じる変異原の吸着溶出パターンを示したものである。

第 1 図



第 2 図



第 3 図

